



Magic MultiS One Step

Cloning kit (单多片段连接)

Magicbio # M501



产品描述

本试剂盒不依赖于 T4 连接酶，不受载体和目的片段的酶切位点限制，采用重叠片段重组的方法，特殊的酶组合可以将任意方法线性化后的载体和与其两端具有 15-25bp 重叠区域的 PCR 片段定向重组连接，快速实现一个或多个片段的高效无缝克隆。

产品组成

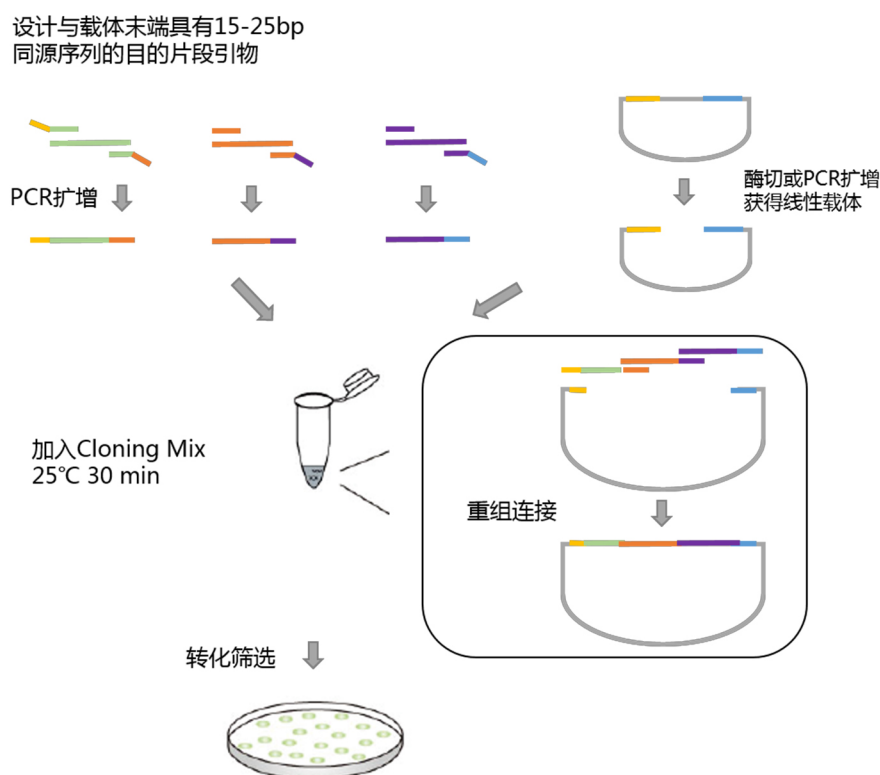
组分	M5011 (20次)
2 × MultiS Cloning Mix	100μl
pUC19 control vector, linearized (50 ng/μl)	5μl
500bp control insert (20 ng/μl)	5μl

储存条件：-20℃保存，避免反复冻融。

产品特点

1. 30分钟可以将一个或多个PCR扩增片段（平端）克隆插入任意载体的任意位置。
2. 不受载体和插入片段酶切位点的可用性和平端/粘性末端的限制，可以在任意位点进行克隆。
3. 无缝克隆，插入点不会引入不需要的碱基序列。
4. 不依赖于连接酶及磷酸酶，高效，准确，克隆阳性率可达95%以上。
5. 室温孵育即可完成片段的连接。

产品原理示意图



线性化载体和插入DNA片段的制备

1. 线性化载体的制备

- 1) 酶切：酶切获得线性载体，平末端或粘端、单酶切或双酶切均可，酶切后胶回收。

注：一步法无缝克隆反应体系内无双链DNA连接酶，不会发生载体自连反应。因此，即使是以单酶切方式制备的线性化载体也无需进行末端脱磷酸处理。重组产物转化后出现的假阳性克隆（无插入片段）是由酶切不完全、未线性化的环状载体转化形成的。我们推荐酶切后胶回收把未线性化载体比例降低到最低程度。

- 2) 反向PCR：建议使用高保真DNA聚合酶制备，扩增后纯化（推荐胶回收纯化）。

2. 插入DNA片段的制备

- 1) 引物设计原则：通过在引物5'端引入线性化克隆载体末端同源序列，使扩增产物之间以及扩增产物与线性化克隆载体之间都具有能够相互同源重组的完全一致的序列（15 bp~25 bp）。

2) 单个插入片段引物设计：克隆引物包括插入片段特异性引物序列和重叠序列。

克隆正向引物(5' -3')：线性载体正向15-25 nt重叠区序列(3' 末端算起)+插入片段正向特异引物序列 (18-25 nt)

克隆反向引物(5' -3')：线性载体反向15-25 nt重叠区序列(3' 末端算起)+插入片段反向特异引物序列 (18-25 nt)

注意：重叠区的碱基数至少15bp，计算扩增引物退火温度时，只需计算基因特异性扩增序列的 T_m 值，载体末端同源序列不应参与计算。

3) 插多个插入片段的克隆引物设计：与载体两端连接的插入片段引物设计方法同单片段设计方法；片段与片段之间连接的插入片段引物设计方法有如下三种：

a. 以前一片段3' 端15 bp - 25 bp 作为同源序列添加至后一片段5' 端；

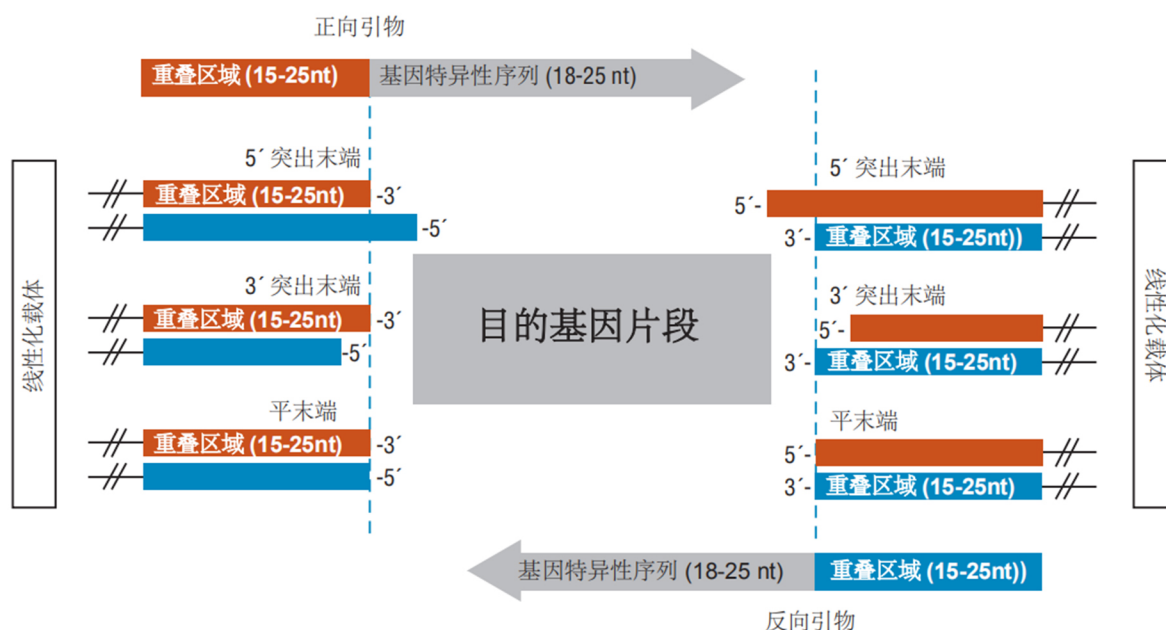
b. 以后一片段5' 端15 bp - 25 bp 作为同源序列添加至前一片段3' 端；

c. 两片各取一部分作为同源序列(总计15 bp - 25 bp)，分别添加至另一片段末端

4) 插入片段扩增：建议使用高保真DNA聚合酶或高保真PCR Mix。

5) 插入片段纯化：用PCR产物纯化试剂盒或胶回收方法纯化扩增的插入片段。

引物设计示意图



重组反应操作方法

1. 按照下表建立反应体系（可使用PCR管在室温配制）

试剂	体积	阴性对照1	阴性对照2	阳性对照
2 × MultiS Cloning Mix *	5 μl	0 μl	0 μl	5 μl
Linear Vector (10-50 ng)	X μl**	X μl	0 μl	1 μl
Insert(s)	Y μl**	0 μl	Y μl	1 μl
dd H ₂ O	To 10 μl	To 10 μl	To 10 μl	To 10 μl

*2 × MultiS Cloning Mix 较粘稠，从冰箱刚取出时更粘稠，可解冻几分钟提高温度、降低粘稠度（不影响质量），轻弹混匀，瞬时离心，缓慢吸取。

** 载体一般用10-50 ng，插入片段与载体的摩尔比在4:1-5:1之间最佳。若载体和多个片段添加体积大于5μl，可改用20μl体系。

2. 轻轻混匀，在PCR仪器上25℃反应30分钟，反应结束后，将PCR管置冰上后直接转化或者保存于-20℃。较长片段或超过3个片段的连接，可以延长反应时间到60分钟。

3. 取5 μl 反应产物按照感受态细胞说明书进行转化（如果转化子较少，可以将所有的产物转化并将所有的转化液涂板）。培养后选择菌落PCR鉴定，提取质粒进行限制性内切酶鉴定或测序鉴定。

